

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Untersuchungen mit dem Lymphocyten- transformationstest u. serologische Studien bei chronischer Hepatitis und anderen Lebererkrankungen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Hermann Ritter
aus
Neumarkt/Oberpfalz

D 29

1969

1970 290

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. A. Kröncke
Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 7. 1969

Die Lymphocytentransformation bei der chronischen Hepatitis und anderen Lebererkrankungen

F. SCHEIFFARTH, H. WARNATZ, R. OTTENJANN und H. RITTER

Abt. für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
(Vorstand : Prof. Dr. F. SCHEIFFARTH)

Eingegangen am 26. März 1969

Lymphocyte Transformation in Chronic Hepatitis and Other Hepatic Diseases

Summary. Lymphocyte transformation under stimulation by autologous hepatic extracts and phytohemagglutinins was studied in 128 patients with various hepatic diseases and 49 normal controls. Circulating lymphocytes from patients with chronic aggressive hepatitis or active cirrhosis showed a significant rise of the transformation rate in cultures to which autologous hepatic extracts had been added. Conversely, equally treated lymphocytes from normals or patients with hepatic steathosis showed no significant rise. The effect of phytohemagglutinins was more pronounced on normal lymphocytes than on lymphocytes from patients with chronic hepatitis, cirrhosis or after acute hepatitis. The significance of lymphocyte transformation for evaluating autoimmune mechanisms in chronic hepatitis is discussed.

Zusammenfassung. Die Lymphocytentransformation unter Stimulierung mit autologem Leberextrakt und mit Phytohämagglutinin wurde bei 128 Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen und bei 49 gesunden Personen untersucht. Bei Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis bzw. mit aktiver Lebercirrhose zeigten die zirkulierenden Lymphocyten eine signifikante Zunahme ihrer Transformationsrate in Kulturen, denen autologer Leberextrakt zugesetzt wurde. Demgegenüber konnte in Lymphocytenkulturen gesunder Personen und von Patienten mit Leberverfettung keine signifikante Zunahme der Blastzellbildung nachgewiesen werden. Die Stimulierbarkeit von Lymphocyten durch Phytohämagglutinin erschien demgegenüber bei Patienten mit chronischer Hepatitis, Lebercirrhose und nach infektiöser Hepatitis vermindert im Vergleich zu Phytohämagglutinin stimulierten Kulturen von Normalpersonen. Die Bedeutung der Lymphocytentransformation für die Beurteilung immunologischer Prozesse bei der chronischen Hepatitis wird diskutiert.

Die Bedeutung von Autoimmunprozessen in der Pathogenese der chronisch aggressiven Hepatitis wurde wiederholt diskutiert [3, 10, 13, 16, 22, 23, 26, 28, 35, 38]. Die Erkrankung ist klinisch durch ihre Prozeßautonomie ausgezeichnet. Bei der chronischen Hepatitis treten zirkulierende Antikörper gegen verschiedene Lebergewebsantigene auf [5, 10,

20, 29, 35, 39, 44]. Allerdings besitzen diese Antikörper keine Korrelation zum Stadium und zum Schweregrad der Erkrankung. Morphologisch finden sich bei der chronischen Hepatitis „piecemeal“-Nekrosen der Parenchymzellen, eine Infiltration der periportalen Felder mit mononucleären Zellen sowie eine Proliferation der Kupfferschen Sternzellen. Die Hypothese, daß mononucleäre Zellen in der Entwicklung der Erkrankung eine Rolle spielen, wird tierexperimentell dadurch gestützt, daß es gelingt, in Mäusen durch Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt zusammen mit Freundschem Adjuvans eine experimentelle Hepatitis zu erzeugen, die mit Lymphocyten übertragen werden kann [40, 43,]. PARONETTO [34] zeigte in seinen Experimenten an Meer-schweinchen, daß nach Sensibilisierung mit Leberextrakt die Migration von Makrophagen dieser Tiere gehemmt wird, wenn sie in einem Medium gezüchtet werden, das Lebergewebsantigen enthält.

Mit Hilfe des Lymphocytentransformationstestes kann die Aktivität von Lymphocyten *in vitro* getestet werden [1, 2, 12, 18, 19, 24, 25, 32, 33, 42]. Dieser Test beruht auf der Beobachtungstatsache, daß Lymphocyten aus dem peripheren Blut spezifisch sensibilisierter Personen in große lymphoblastenähnliche Zellen transformieren, wenn das entsprechende Antigen dem Nährmedium zugegeben wird. Diese Zellen besitzen einen erhöhten DNS-Stoffwechsel, was durch die Aufnahme von ^3H -Thymidin in die Lymphocyten nachgewiesen werden kann [6, 8, 9, 41]. TOBIAS u. Mitarb. [42] berichteten über Untersuchungsergebnisse, nach denen Lymphocyten von Patienten mit chronischer Hepatitis durch Zugabe von autologem Leberextrakt zur vermehrten Blastzellbildung stimuliert wurden. MELLA u. Mitarb. [29a] fanden demgegenüber, daß die Blastzellbildung bei Patienten mit chronischer Hepatitis unter Zugabe von Phytohämagglutinin vermindert ist.

In den folgenden Untersuchungen wurden Lymphocyten des peripheren Blutes von Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis und anderen Lebererkrankungen mit homogenisiertem autologem Lebergewebeextrakt bzw. Phytohämagglutinin gezüchtet. Es sollte gezeigt werden, inwieweit sich die Untersuchungsergebnisse von TOBIAS und MELLA bestätigen lassen, d. h. Lymphocyten von Patienten mit Lebererkrankungen eine veränderte Transformationskapazität *in vitro* zeigen. Gleichzeitig wurde das Serum der Patienten auf zirkulierende leberspezifische Antikörper untersucht.

Methoden

Krankengut

Blutlymphocyten von 49 Personen mit normaler Leberhistologie und von 128 Patienten mit Lebererkrankungen wurden untersucht. 56 Patienten zeigten histologisch eine fettige Degeneration der Leberparenchymzellen, 34 hatten eine

chronisch aggressive Hepatitis und 16 eine aktive Lebercirrhose. Bei 22 Patienten wurden die Untersuchungen 3—4 Monate nach infektiöser Hepatitis vorgenommen.

Lymphocytenkulturtechnik

25—50 ml Venenblut, dem 500 E Heparin zugefügt wurden, wurden in der Entnahmespritze unter einem Winkel von 45° für 1 Std bei 37°C im Brutschrank aufgestellt. Nach Absedimentieren wurde das überstehende Plasma entnommen. Die Anreicherung der Lymphocyten erfolgte unter Ausnützung der größeren Haftfähigkeit der Granulocyten und Makrophagen an Glaswänden. Bei der Zellzählung entsprachen 80—90% der kernhaltigen Zellen Lymphocyten.

Diese Zellen wurden in einem Gewebekulturmedium gezüchtet, das aus 80% Eagles Medium (Behringswerke) und 20% nicht inaktiviertem AB-Serum normaler Blutspender bestand. 100 IE Penicillin und 0,1 mg Streptomycin wurden pro ml Nährmedium hinzugefügt; das pH wurde auf 7,4 mit einer 4% Natriumbicarbonatlösung eingestellt. Durch Seitzfiltration wurde das Medium sterilisiert. Alle Kulturen wurden doppelt angesetzt. 10×10^6 Lymphocyten wurden in 10 ml Nährmedium entweder ohne Zusatz (N-Kultur), mit Zusatz von 0,2 ml Phytohämagglutinin M (Difco-Lab.) (P-Kultur) oder mit dem Homogenat autologer Leber (E-Kultur) gezüchtet. Das Leberbiopsiematerial wurde sofort nach der Punktion eingefroren und bei -20°C bis zum Ansetzen der Kulturen gelagert. Nach dem Auftauen wurde es in einem Potter-Elvehjem-Gerät homogenisiert und in einer Konzentration entsprechend 0,05 g Leberfeuchtgewicht den Kulturen zugesetzt. Die P-Kulturen wurden nach 3 Tagen, die N- und E-Kulturen nach 5 Tagen entnommen.

Morphologische Beurteilung

Zur Herstellung der mikroskopischen Präparate wurden die Zellkulturen bei 700 Upm 10 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in einem Gemisch von 3 Teilen Äthanol und einem Teil Eisessig fixiert und nach Resuspendierung auf einem tiefgeköhlten Objektträger ausgebreitet. In nach PAPPENHEIM gefärbten Präparaten wurde die Transformationsrate in 1000 Zellen nach morphologischen Kriterien bestimmt. Als transformiert wurden Zellen angesehen mit einem größeren Kerndurchmesser als dem doppelten Erythrocytendurchmesser, mit einer aufgelockerten Chromatinstruktur des Kerns, mit Nucleolen sowie mit einem basophilen Cytoplasma. Tote Zellen wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt.

Autoradiographie nach Inkorporation von ^3H -Thymidin

Autoradiographische Präparate wurden von 42 Patienten angefertigt. 24 Std vor Entnahme der Kulturen wurde dem Nährmedium $10 \mu\text{C}$ ^3H -Thymidin der spezifischen Aktivität 3000 mC/mM zugefügt. Die Fixierung der Zellen und die Herstellung der Objektträgerpräparate erfolgte wie oben angegeben. Die Autoradiogramme wurden nach der Filmstripping-Methode mit Kodak-Autoradiographieplatten Typ AR 10 angefertigt. Nach einer Expositionszeit von 15 bis 21 Tagen wurden die Filme entwickelt, gefärbt und die markierten Zellen unter 1000 Zellen gezählt. Eine Zelle wurde als markiert beurteilt, wenn sie mindestens die dreifache Zahl der Granula des Backgrounds zeigte.

Untersuchungen auf zirkulierende Antikörper

Zum Nachweis zirkulierender Antikörper wurden die Doppeldiffusionstechnik im Agargel nach OUCHTERLONY, die passive Hämagglutinationstechnik und die

Immunfluoreszenztechnik verwendet [4, 7, 17]. Für die Präcipitations- und Häm-agglutinationsversuche wurde ein homologer Leberextrakt als antigenes Material verwendet. Die Bindung leberspezifischer Antikörper an homologe Leberschnitte wurde mit einer modifizierten indirekten Immunfluoreszenztechnik nachgewiesen. Schnitte homologer Leber wurden mit den Seren der Patienten inkubiert. Fixierte Antikörper wurden entweder durch Inkubation mit menschlichem Komplement und fluoreszenzmarkiertem Anti- $\beta 1A/\beta 1C$ -Serum vom Kaninchen (Behringswerke) oder mit fluoreszenzmarkiertem Anti-IgG-Serum vom Kaninchen (Behringwerke) dargestellt.

Ergebnisse

Zum Zeitpunkt der Kulturentnahme waren durchschnittlich nurmehr 30—60 % der ursprünglich angesetzten 10×10^6 Lymphocyten lebendig, wie durch Zellzählungen mit 1 % Trypanblaulösung nachgewiesen werden konnte. In den P-Kulturen erwies sich wegen der starken Zellagglutination eine Zellzählung als schwierig. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zellzahlen der N- und der E-Kulturen ließen sich nicht nachweisen. Lediglich in den Lymphocytenkulturen von Patienten mit chronischer Hepatitis lag der Zellgehalt im Durchschnitt niedriger als in den Zellkulturen normaler Personen.

Die Ergebnisse des Lymphocytentransformationstestes, die durch morphologische Beurteilung oder mit autoradiographischer Technik erhalten wurden, sind in der Abb. 1a für die P-Kulturen und in Abb. 1b für die E-Kulturen wiedergegeben. Die Mittelwerte der Transformationsraten sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Der Anteil transformierter Zellen betrug bei den N-Kulturen in der Regel unter 5 %. Eine Stimulation der Lymphocyten blieb in den E-Kulturen der Patienten mit Leberepithelverfettung sowie in den Kontrollen mit histologischem Normalbefund der Leber aus. Demgegenüber war der Gehalt an Blastzellen in den E-Kulturen von Patienten mit

Tabelle 1. *Ergebnisse des Lymphocytentransformationstestes bei Lebererkrankungen. Die Auswertung erfolgte nach morphologischen Kriterien bzw. mit autoradiographischer Technik. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Transformationsraten wurden getrennt wiedergegeben für Kulturen ohne Zusatz (N-Kulturen), für Kulturen mit Zusatz von Phytohämagglutinin (P-Kultur) und für Kulturen mit Zusatz von autologem Leberextrakt (E-Kultur)*

Diagnose	Zahl der Fälle	Transformationsrate in Prozent		
		N-Kultur	E-Kultur	P-Kultur
Normalbefund	49	$2,9 \pm 2,38$	$4,4 \pm 2,55$	$66,6 \pm 27,94$
Leberverfettung	56	$2,4 \pm 2,01$	$4,4 \pm 2,78$	$62,2 \pm 19,72$
Infektiöse Hepatitis	22	$4,7 \pm 3,56$	$8,6 \pm 5,04$	$50,8 \pm 25,69$
Chronische Hepatitis	34	$4,5 \pm 2,93$	$14,3 \pm 5,81$	$53,2 \pm 22,74$
Aktive Cirrhose	16	$3,8 \pm 2,67$	$15,7 \pm 4,37$	$50,2 \pm 18,28$

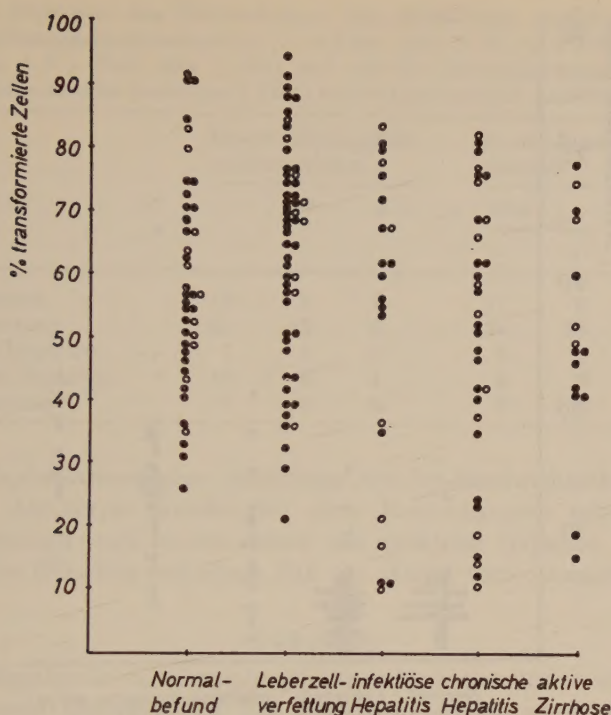


Abb. 1a. Prozentgehalt transformierter Zellen in Lymphocytenkulturen von normalen Personen und von Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen nach Stimulierung mit Phytohämagglutinin. Die geschlossenen Kreise entsprechen Kulturen, die morphologisch ausgewertet wurden, die offenen Kreise solchen, von denen Autoradiogramme nach Inkubierung mit ^3H -Thymidin angefertigt wurden

chronischer Hepatitis signifikant ($0,025 > P > 0,01$) erhöht; dasselbe gilt von den E-Kulturen der Patienten mit aktiver Cirrhose ($0,01 > P > 0,005$). Auch bei den E-Kulturen von Patienten mit infektiöser Hepatitis, die sich im Durchschnitt im 3. bis 6. Monat nach Ausbruch der akuten Erkrankung befanden, konnte eine Stimulation der Lymphocyten zu gesteigerter Blastzellbildung beobachtet werden; hier waren allerdings die Unterschiede zu den Prozentzahlen transformierter Zellen in den N-Kulturen nicht signifikant.

Durch Phytohämagglutinin wurde die Blastzellbildung in den Kulturen der Kontrollpersonen mit normaler Leberhistologie zwar durchschnittlich stärker stimuliert als in den Kulturen der Patienten mit chronischer Hepatitis, aktiver Cirrhose oder infektiöser Hepatitis; die Unterschiede waren jedoch bei der statistischen Berechnung nicht signifikant. Bemerkenswerterweise lagen die Transformationsraten bei der infektiösen

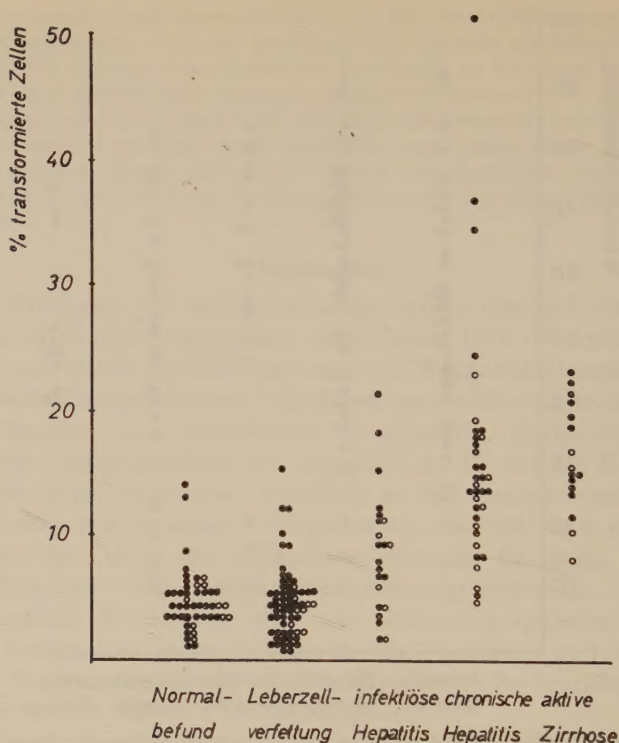


Abb. 1b. Prozentgehalt transformierter Zellen in Lymphocytenkulturen von normalen Personen und von Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen nach Inkubierung mit autologem Leberextrakt. Die geschlossenen Kreise entsprechen Kulturen, die nach morphologischen Kriterien beurteilt wurden, die offenen Kreise solchen, die autoradiographisch nach Zugabe von ^3H -Thymidin ausgewertet wurden

Hepatitis umso höher, je länger das Intervall zwischen der akuten Erkrankung und dem Zeitpunkt der Lymphocytenkultur war. Die Ergebnisse, die bei morphologischer Auswertung erhalten wurden und die sich bei autoradiographischer Technik ergaben, lagen im gleichen Größenordnungsbereich, wie aus den Diagrammen 1a und 1b ersichtlich ist.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Leberspezifische präzipitierende Antikörper konnten mit der Ouchterlonytechnik in keinem Falle nachgewiesen werden. Agglutinierende Antikörper fanden sich demgegenüber in allen untersuchten Gruppen von Lebererkrankungen und auch die Titer der Antikörper gegen Lebergewebsantigene zeigten keine Unterschiede. Dem entsprachen die Ergebnisse der Immunfluoreszenztechnik zum Nach-

Tabelle 2. *Ergebnisse der Untersuchungen auf zirkulierende Antikörper mit der passiven Hämagglutinationsreaktion (— = Titer unter 1:16, + = Titer von 1:16 bis 1:128, ++ = Titer über 1:128) und mit der Immunfluoreszenztechnik auf anticytoplasmatische Antikörper (AZA) und auf antinucleäre Antikörper (ANA)*

Diagnose	Passive Hämagglutinationsreaktion			Immunfluoreszenzreaktion		
	—	+	++	AZA		ANA +
				—	+	
Normalbefund	19	8	4	17	9	1
Leberverfettung	21	12	5	16	16	0
Infektiöse Hepatitis	7	5	2	8	4	2
Chronische Hepatitis	10	4	4	8	9	2
Aktive Cirrhose	5	4	2	6	1	1

weis anticytoplasmatischer Antikörper mit der Sandwichtechnik. Antinucleäre Antikörper wurden bei einer Kontrollperson mit normaler Leberhistologie sowie in zwei Fällen von infektiöser Hepatitis, chronisch aggressiver Hepatitis und einem Fall von aktiver Cirrhose nachgewiesen.

Diskussion

Die Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes zeigen, daß zirkulierende Lymphocyten von Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis und aktiver Cirrhose häufiger zu einer erhöhten Blastzellbildung stimuliert werden bei Zusatz von autologem Leberextrakt zu den Kulturen als vergleichsweise Lymphocyten von Normalpersonen. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit den Befunden von TOBIAS et al. [42], nach denen ebenfalls eine erhöhte Stimulierbarkeit der Lymphocyten bei Patienten mit chronischer Hepatitis besteht. Bei einer Reihe von Patienten mit dieser Erkrankung ließ sich jedoch in unseren Untersuchungen keine erhöhte Transformierbarkeit der Lymphocyten nachweisen. Insbesondere bestand keine Korrelation zwischen dem klinischen und histologisch nachweisbaren Schweregrad der chronischen Hepatitis und der Transformationsrate der Lymphocyten in den E-Kulturen. So zeigten z. B. vier der sieben Patienten mit einer Transformationsrate unter 10% in den E-Kulturen das klinische und histologische Bild einer schweren Verlaufsform der chronisch aggressiven Hepatitis.

Eine verminderte Stimulierbarkeit der Lymphocyten von Patienten mit chronischer Hepatitis unter Phytohämagglutinin ließ sich in unseren Experimenten statistisch nicht sichern, wenn sich auch insgesamt der Eindruck ergab, daß Lymphocyten von Normalpersonen und Patienten mit Leberverfettung eine höhere Transformationsrate zeigten. Eine

Korrelation bestand regelmäßig zwischen dem Gehalt an transformierten Zellen in den E- und P-Kulturen. Patienten mit chronischer Hepatitis, deren Lymphocyten durch Phytohämagglutinin vermindert stimulierbar waren, zeigten auch niedrige Transformationsraten bei Zusatz von autologem Leberextrakt. Diese Tatsache ist insbesondere auch deshalb von Bedeutung, da eine Depression der Transformationsfähigkeit von Lymphocyten, wie sie bei Erkrankungen des lymphatischen Systems bekannt ist, jüngst auch bei Autoimmunprozessen wie etwa dem Sjögren-Syndrom, beschrieben wurde [12, 18, 24].

In unseren Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen, die morphologisch und denen, die autoradiographisch ausgewertet wurden, nachgewiesen werden. Dabei kommt der Inkubationszeit mit ^3H -Thymidin eine wesentliche Bedeutung zu, wie SCHELLEKENS und EIJSVOOGEL [41] zeigen konnten. Diese Autoren beobachten während einer 24stündigen Inkubationszeit mit ^3H -Thymidin einen linearen Anstieg an tritiummarkierten Zellen. Von besonderer Wichtigkeit für die Ergebnisse des Transformationstestes sind ferner Art und Menge des den Kulturen zugesetzten autologen Leberextraktes. Der autologe Leberextrakt, der in unseren Experimenten benutzt wurde, besitzt ein großes Spektrum an antigenen Komponenten und Kreuzreaktionen mit anderen Organproteinen sind daher zu erwarten. Kulturen von Patienten mit erhöhtem Gehalt an transformierten Zellen in den E-Kulturen zeigten meist auch eine leicht erhöhte Stimulierbarkeit der Lymphocyten, wenn ihnen statt Leberextrakt ein Nierenhomogenat zugesetzt wurde. Vorläufige Untersuchungen lassen schließlich darauf schließen, daß auch die Dosierung des Organextraktes von wesentlicher Bedeutung für das Ergebnis des Transformationstestes ist. So konnte durch Zugabe von 0,4 g Leberhomogenat nahezu regelmäßig eine Depression der Transformationsraten erzielt werden im Vergleich zu Kulturen, denen 0,02 g zugesetzt wurde. Die Ergebnisse des Lymphocytentransformationstestes lassen insgesamt darauf schließen, daß celluläre Immunmechanismen eine Rolle in der Entwicklung der chronisch aggressiven Hepatitis spielen. Zieht man allerdings in Erwägung, daß die Transformationsfähigkeit der Lymphocyten bei dieser Erkrankung unter Phytohämagglutinin eher vermindert erscheint und eine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Transformationsrate nicht nachweisbar ist, so werden weitere Untersuchungen notwendig, um die Bedeutung der Lymphocyten in der Pathogenese der chronisch aggressiven Hepatitis zu klären.

Literatur

1. ASTALDI, G.: Das Phytohämagglutinin und das Problem der Lymphocyten. Med. Klin. 59, 368 (1964).

2. BAIN, B., M. R. VAS, and L. LOWENSTEIN: The development of large immature mononuclear cells in mixed leukocyte cultures. *Blood* **23**, 108 (1964).
3. BEARN, A. B., H. KUNKEL, and R. J. SLATER: The problem of chronic liver diseases in young women. *Amer. J. Med.* **21**, 3 (1956).
4. BOYDEN, S. V.: Adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. exp. Med.* **93**, 107 (1951).
5. CALABRESI, P., and M. GREENBERG: Circulating antinuclear globulines in patients with chronic liver disease. *J. clin. Invest.* **39**, 976 (1960).
6. CARON, G. A., I. SARKANY, H. S. WILLIAMS, A. P. TODD, and H. M. C. GELL: Radioactive method for the measurement of lymphocyte transformation in vitro. *Lancet* (1965) **II**, 1266.
7. COONS, A. H., and M. KAPLAN: Localization of antigen in tissue cells. *J. exp. Med.* **88**, 1 (1950).
8. COOPER, E. H.: Measuring lymphocyte transformation *Lancet* (1966) **I**, 51.
9. COOPER, H. L., and A. D. RUBIN: RNA Metabolism in lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin: Initial responses to phytohemagglutinin. *Blood* **25**, 1014 (1965).
10. COPPO, M., G. TEDESCHI, u. I. ROBBA: Serologische und immunologische Untersuchungen bei chronischer Hepatitis. *Z. Gastroent.* **2**, 269 (1964).
11. DAMESHEK, W.: Autoimmunity: Theoretical aspects. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **124**, 6 (1965).
12. ELVES, M. W.: The lymphocytes. London: LLOYD-Luke, 1966.
13. GAJDUSEK, D. C.: An autoimmune reaction against human tissue antigens in certain acute and chronic diseases. *Nature (Land.)* **179**, 666 (1957).
14. GILL, F. A.: The association of increased spontaneous lymphocyte transformation in vitro with clinical manifestations of drug hypersensitivity. *J. Immunol.* **98** 778 (1967).
15. GIRARD, N. R., M. L. KUNZ, and KOBAYASHI S.: In vitro lymphocyte transformation in atopic patients induced by antigens. *J. Allergy* **39**, 65 (1967).
16. GÖKÇEN, M.: Autoimmunity in liver disease. *J. Lab. clin. Med.* **59**, 533 (1962).
17. GOLDSTEIN, G., J. SLIZYS, and M. R. CHASE: Studies on fluorescent antibody staining. *J. exp. Med.* **114**, 89 (1961).
18. GOWANS, J. L., and D. D. MCGREGOR: The immunological activities of lymphocytes. *Progr. Allergy* **9**, 1 (1965).
19. GROPP, A., u. R. FISCHER: Ergebnisse der Züchtung von Lymphocyten in vitro. *Klin. Wschr.* **44**, 665 (1966).
20. HACKETT, E., M. BEECH, and S. J. FORBES: Autoimmune complement fixation reaction in 1024 patients. *Brit. Med. J.* **1960** **II**, 17.
21. HALPERN, B., N. T. KY, and N. AMACHE: Diagnosis of drug allergy in vitro with the lymphocyte transformation test. *J. Allergy* **40**, 168 (1967).
22. HARDERS, H., u. W. DÖLLE: Das Syndrom der lupoiden Hepatitis. *Gastroenterologia (Basel)* **100**, 220 (1963).
23. HENNING, N., F. SCHEIFFARTH, H. WARNATZ, R. GROMOTKA u. H. NUSSELT: Fluoreszenzserologische Untersuchungen an Biopsiematerial von pathologisch verändertem Lebergewebe. *Z. Gastroent.* **1**, 221 (1963).
24. HIRSCHHORN, K., F. BACH, and L. R. KOLODNY: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science* **142**, 1185 (1963).
25. — R. R. SCHREIBMANN, S. VERBO, and R. H. GRUSKIN: Action of streptolysin on peripheral lymphocytes of normal subjects and patients with acute rheumatic fever. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **52**, 1151 (1964).
26. HUNTER, F. M., R. W. SPARKE, and R. T. SALZMANN: Autoagglutinin in hepatic disease. *Gastroenterology* **39**, 394 (1960).

27. LEVENTHAL, B. G., D. S. WALDORF, and N. TALAL: Impaired lymphocyte transformation and delayed hypersensitivity in Sjögren's syndrome. *J. clin. Invest.* **46**, 1338 (1967).
28. MACKAY, I. R.: Primary biliary cirrhosis showing a high titer of antibody. *New Engl. J. Med.* **258**, 185 (1958).
29. —, and L. LARKIN: The significance of the presence in human serum of complement fixing antibodies to human tissue antigens. *Aust. Ann Med.* **7**, 251 (1958).
- 29a. MELLA, B., and D. J. LANG: Leucocyte mitosis: suppression in vitro associated with acute infectious hepatitis. *Science* **155**, 80 (1967).
30. MIESCHER, P. S., A. BRAVERMANN, and E. L. AMOROS: Progressive hypergammaglobulinämische Hepatitis. *Dtsch. med. Wschr.* **91**, 1525 (1966).
31. MILLS, J. A.: The immunological significance of lymphocyte transformation. *J. Immunol.* **97**, 239 (1966).
32. MOORE, G. E., E. R. GERNER, and H. A. FRANKLIN: Culture of normal human leukocytes. *J. Amer. med. Ass.* **199**, 519 (1967).
33. NASPITZ, Ch. K., and M. RICHTER: The action of Phytohemagglutinin in vivo and in vitro. *Progr. Allergy* **12**, 1 (1968).
34. PARONETTO, F.: Immune reactions and hepatic alterations in guinea pigs sensitized with altered hepatic proteins. In: *Immunopathology. Vth Internat. Symposium* (P. A. MIESCHER and P. GRABAR ed.), p. 121. Basel u. Stuttgart: Schwabe 1967.
35. — F. SCHAFFNER, D. R. MUTTER, J. C. KNIFFEN, and H. Popper: Circulating antibodies in liver diseases. *J. Amer. med. Ass.* **187**, 503 (1964).
36. ROITT, I. M., and D. DONACH: Delayed hypersensitivity in autoimmune disease. *Brit. med. Bull.* **23**, 66 (1967).
37. SCHEIFFARTH, F.: Stand der Immunpathologie auf dem Gebiet der chronischen Hepatitis. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 1968 (im Druck).
38. —, u. H. WARNATZ: Zur Immunpathogenese der chronischen Hepatitis. *Klin. Wschr.* **43**, 473 (1965).
39. — H. WARNATZ, and H. G. Essing: Serological studies of autoantibodies in acute and chronic live disease. *Int. Arch Allergy* **28**, 240 (1965).
40. — —, and K. MAYER: Studies concerning the importance of mononuclear cells in the development of experimental hepatitis. *J. Immunol.* **98**, 396 (1966).
41. SCHELLEKENS, P. Th. A., and V. P. EIJSVOOGEL: Lymphocyte transformation in vitro. I. Tissue culture conditions and quantitative measurements. *Clin. exp. Immunol.* **3**, 571 (1968).
42. TOBIAS, H., A. P. SAFRAN, and F. SCHAFFNER: Lymphocyte stimulation and chronic liver disease. *Lancet* **1967 I**, 193.
43. WARNATZ, H., F. SCHEIFFARTH u. E. LIEBELT: Studien zur Übertragbarkeit der experimentellen Hepatitis im Parabioseversuch. *Z. Immun. Forsch.* **133**, 60 (1968).
44. WEIR, D. M., HOLBOROW E. J., and G. D. JOHNSON: Clinical study of serum antinuclear factor. *Brit med J.* **1961 I**, 933.

Prof. Dr F. SCHEIFFARTH
 Abt. für klinische Immunologie
 des Universitäts-Krankenhauses
 8520 Erlangen
 Krankenhausstr. 12

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank aussprechen:

Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. H. Warnatz für die freundliche Beratung und die tatkräftige Unterstützung.

Mein Dank gilt weiter Frau H. Leowald und Herrn E. Rückert für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Die Ausführungen der umfangreichen Untersuchungen wurde mit Hilfe mehrerer Kliniken ermöglicht.

An erster Stelle muß Herrn Professor Dr. L. Demling, Direktor der Med. Universitätsklinik und Herrn Privatdozenten Dr. R. Ottenjann, Oberarzt der Med. Universitätsklinik gedankt werden, die den größten Teil des Untersuchungsmaterials zur Verfügung stellten.

Weiter möchte ich danken den Ärzten der Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Neumarkt/Opf., Herrn Chefarzt Dr. A. Hörauf, Oberarzt Dr. J. Oltersdorf, Dr. H. Brand, sowie dem Vorstand der I. Medizinischen Klinik der Städt. Krankenanstalten Nürnberg, Dozent Dr. H. H. Seßner und Dr. E. Kalkbrenner für ihr freundliches Verständnis und die uneigennützig Überlassung von Untersuchungsmaterial.

L e b e n s l a u f

Hermann Otmar Ritter

27. Februar 1943 geboren in Neumarkt/Oberpfalz als einziger Sohn des Oberfeldwebels Josef Ritter, 1945 gefallen in Berlin, und seiner Ehefrau Maria, geb. Sirl

Bekenntnis: römisch-katholisch

Herbst 1949 - Juli 1953 Besuch der Volksschule Neumarkt/Oberpfalz

Herbst 1953 Eintritt in die Oberrealschule Neumarkt/Oberpfalz

Juni/Juli 1963 Ablegung der Reifeprüfung

November 1963 Beginn des Medizinstudiums an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

6. August 1964 Ablegung der Naturwissenschaftlichen Vorprüfung an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und Verbleib an der Universität

5. Mai 1966 Ablegung der Ärztlichen Vorprüfung an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Sommersemester 1966 und Wintersemester 1966/67 Besuch der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck/Österreich

Sommersemester 1967 Rückkehr an die Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und Fortsetzung des Medizinstudiums.

Am 16. Juli 1969 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

